

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND20. 10. 2004
EP04/10661

REC'D 05 NOV 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung****PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Aktenzeichen:**

103 47 472.2

Anmeldetag:

1. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber:

Universität Tübingen, 72074 Tübingen/DE

Bezeichnung:

Polyzyklische Makrolactone

IPC:

C 07 D, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. September 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Wallner

Anmelderin: Universität Tübingen
Wilhelmstraße 5

72074 Tübingen

Unser Zeichen: P 43 326 DE

01. Oktober 2003
TM/GS/nw

Beschreibung

Polyzyklische Makrolactone

5

Die Erfindung betrifft neue Substanzen, Verfahren zu deren Herstellung, Verwendung dieser Substanzen und pharmazeutische Zusammensetzungen.

- 10 Infektionskrankheiten stellen nach wie vor weltweit ein sehr großes medizinisches Problem dar. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die zunehmend auftretenden Resistenzen von Erregern, insbesondere bei bakteriellen Erregern, wodurch diese Erreger auf die derzeit verfügbaren Medikamente nicht mehr reagieren. Zunehmend treten auch Bakterien
- 15 auf, die gegen eine ganze Bandbreite von Wirkstoffen resistent sind, man spricht hier von multiresistenten Erregern. Viele der pathogenen multiresistenten Gram-positiven Bakterien, wie z. B. die multiresistenten und Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) sind derzeit nur noch mit Glycopeptid-Antibiotika vom Vancomycin/Teicoplanin-Typ therapierbar. Es ist nur eine Frage der Zeit, bis vermehrt multi-
- 20 tiresistente, einschließlich Vancomycin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme im Klinikbereich auftreten werden. Derart super-multi-

resistente Stämme wurden bereits vereinzelt diagnostiziert und bedeuten für den infizierten Patienten den Tod, da sie nicht therapierbar sind.

Die Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, neue Substanzen bereitzustellen, die als Wirkstoffe zur Bekämpfung von Erregern, insbesondere von bakteriellen Erregern, geeignet sind und so als neue Antibiotika eingesetzt werden können. Solche neuen Substanzen sollen als Leitstrukturen dienen können, um daraus weitere wirksame Substanzen entwickeln zu können.

Diese Aufgabe wird gelöst durch eine Substanz, wie sie in den Ansprüchen 1, 5, 9, 10 und 11 beschrieben ist. Die Ansprüche 12 und 13 befassen sich mit entsprechenden pharmazeutischen Zusammensetzungen. Die Ansprüche 14 bis 17 sowie der Anspruch 21 betreffen entsprechende Verwendungen der erfindungsgemäßen Substanzen bzw. ein Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen. Die Ansprüche 22 und 24 richten sich auf einen Mikroorganismus, der Anspruch 25 beschreibt ein geeignetes Verfahren zur Herstellung der Substanzen. In den verschiedenen abhängigen Ansprüchen werden bevorzugte Ausführungsformen dieser Gegenstände beschrieben. Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

Die erfindungsgemäße Substanz ist dadurch gekennzeichnet, daß es sich dabei um ein polyzyklisches Makrolacton handelt, welches von einem Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosispora* herstellbar ist. Diese Substanz wird vorteilhafterweise von dem Bakterium sekretiert, d. h., daß sie bei einer Kultivierung des Bakteriums in den Kulturüberstand abgegeben wird. Besonders bevorzugt ist es, wenn diese Substanz pharmakologische Wirkung und insbesondere antibiotische Wirkung entwickelt. In einer bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Substanz diese antibiotische Wirkung vor allem gegenüber

Gram-positiven Bakterien auf. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeigt die erfindungsgemäße Substanz cytotoxische Wirkung.

Die Erfinder konnten bevorzugte Ausführungsformen dieser erfindungsgemäßen Substanz durch die Isolierung und Charakterisierung eines neuen Bakterienstammes aus der Gattung *Verrucosispora* gewinnen. Dieser Stamm, der im folgenden als AB 18-032 bezeichnet wird, wurde aus einem Meeressediment isoliert, das aus 1000 m Tiefe in der Sagami-Bay in der japanischen See gesammelt wurde. Der Stamm wurde bei der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) unter der DSM Nr. 15899 hinterlegt. Besonders bevorzugt ist es daher, daß die erfindungsgemäßen Substanzen von dem Bakterienstamm AB 18-032 herstellbar sind.

Der Bakterienstamm AB 18-032 hat die folgenden beschriebenen morphologischen Charakteristika. Der Stamm wächst als Oberflächenkultur auf standardmäßigen Komplexagarmedien, wie z. B. ISP-2 Komplexmedium (0,4 % Hefeextrakt, 1 % Malzextrakt, 0,4 % Glukose, 1,5 % Agar) als orange-rote Kolonien, die sich nach ca. zweiwöchiger Inkubation bei 27 °C aufgrund der Sporulation schwarz verfärben. Fig. 1 zeigt eine raster-elektronenmikroskopische Aufnahme des sporulierten Substratmyzels. Die chemotaxonomischen Eigenschaften des Stammes AB 18-032 sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Chemotaxonomische Charakterisierung des Stammes AB 18-032

Peptidoglucan	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure, der Acyltyp der Mureminsäure ist Glycolyl-(A1γ')
Gesamtzellzucker	Xylose Mannose
Isoprenoidchinone	MK9 (H ₄) als vorwiegendes Menachinon
Polare Lipide	Type II (Anwesenheit von Diphosphatidylethanolamin)

Für eine präzise phylogenetische Zuordnung wurde die komplette Nukleinsäuresequenz des Gens für die 16S ribosomale RNA durch direkte Sequenzierung der PCR-amplifizierten 16S rDNA bestimmt [Chun, J. & M. Goodfellow (1995), Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 240-245; Kim, S. B., C. Falkoner, S. T. Williams & M. Goodfellow (1998), J. Syst. Bacteriol. 48: 59-88]. Danach erfolgte der Vergleich der Sequenzdaten mit den bekannten Sequenzen von Vertretern der Unterordnung *Micromonosporineae*. Die höchste Übereinstimmung der Sequenz von AB 18-032 wurde zu *Verrucosipora giffhornensis* mit 99,65 % gefunden. In Fig. 2 ist die Sequenz des Gens für die 16S rRNA von AB 18-032 dargestellt (SEQ ID No. 1). Aus dem Vergleich der Sequenzdaten für den Stamm AB 18-032 mit den bekannten Sequenzen der 16S rRNA von Vertretern der Unterordnung *Micromonosporineae* ergab sich die Position des Stammes dieser Erfindung auf dem phylogenetischen Stammbaum der *Micromonosporineae*, welcher in Fig. 3 dargestellt ist. Aufgrund der phylogenetischen Analyse der 16S rRNA sowie der oben beschriebenen morphologischen und chemotaxonomischen Eigenschaften konnte der Stamm AB 18-032 zu der seltenen Actinomyceten-Gattung *Verrucosipora* zugeordnet werden. Dieser Stamm ist der erste marine Vertreter dieser Gattung und ist die zweite bislang in der Literatur beschriebene Art dieser Gattung.

Zur weiteren Charakterisierung des neuen Stammes AB 18-032 wurden seine phänotypischen Eigenschaften im Vergleich mit dem bekannten Stamm *Verrucosipora gifhornensis* [DSM 44337; Rheims, H., P. Schumann, M. Rohde & E. Stackebrandt (1998), Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 1119-1127] untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften des Stammes AB 18-032 und seines nächsten phylogenetischen Verwandten *Verrucosipora gifhornensis* DSM 44337

	<i>Verrucosipora gifhornensis</i> ¹ DSM 44337	Stamm AB 18-032
Kohlenstoffverwertung:		
D(+)-Xylose	++	-
D(-)-Ribose	-	-
D-Fructose	-	-
D(+)-Glucose	++	+
D(+)-Galactose	+	-
D-Mannose	±	++
Maltose	+	++
Saccharose	+	++
D(+)-α-Trehalose	+	++
L(+)-Arabinose	++	++
L(-)-Rhamnose	-	-
L(-)-Sorbose	-	-
α-Lactose	-	+
α-Melibiose	-	+
D(+)-Melezitose	-	+
D(+)-Raffinose	-	+
Glycerin	-	+

Dulcitol	-	+
<i>meso</i> -Inosit	-	+
D-Sorbit	-	+
D-Mannit	-	+
Salicin	+	+

Stickstoffverwertung:

DL-Serin	+	++
L-Asparaginsäure	+	+
L-Glutaminsäure	+	++
L-Histidin	+	+
L-Arginin	+	++
L-Alanin	±	++
L-Valin	±	++
L-Methionin	-	++
L-Phenylalanin	+	++
L-Tryptophan	-	++
Casein	p	p
Cellulose-Abbau	n	n
Gelatine-Verflüssigung	p	nb
Bildung von Nitrat aus Nitrit	n	n
Stärkehydrolyse	p	p

¹ Daten von Rheims *et al.* (1998)

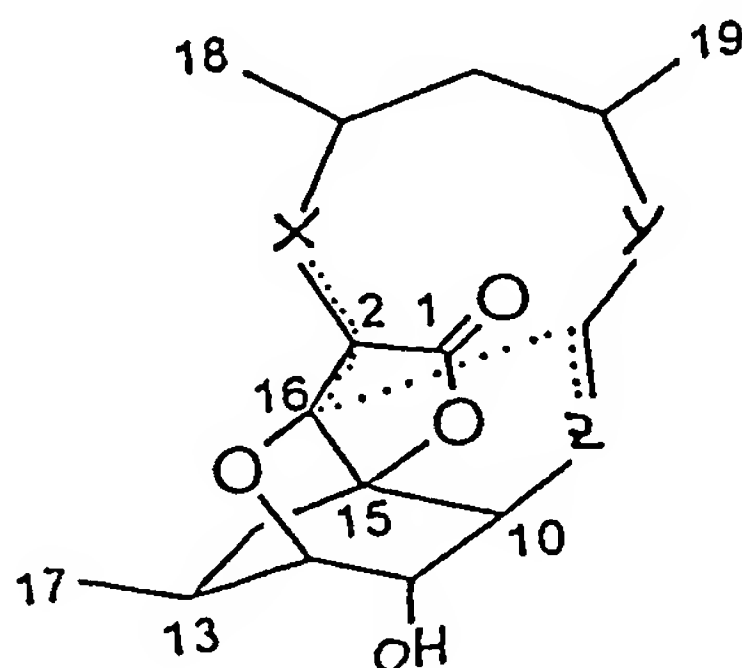
++ , gute Verwertung; + , normale Verwertung; ± , schlechte Verwertung;
 - , keine Verwertung; p , positiv; n , negativ; nb , nicht bestimmt

5

Dieser erstmals von den Erfindern isolierte und charakterisierte Vertreter der Gattung *Verrucosispora* produziert verschiedene Substanzen, die vorteilhafterweise pharmakologische Wirkung entfalten. Diese Substanzen werden im folgenden unter der Bezeichnung Abyssomicine zusammengefaßt.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Substanzen durch die allgemeine Formel I



gekennzeichnet. Hierbei bezeichnet

X: C=O oder
C-OH

Y: $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O-} \end{array}$ oder
C=O

Z: C=N- oder
CH oder
CH₂

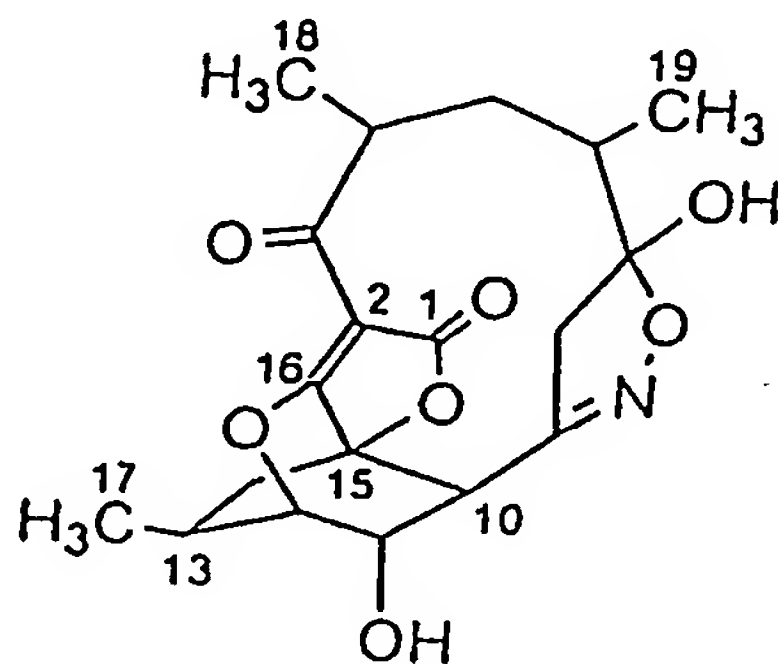
Die punktierten Linien deuten Bindungen an, die vorhanden sein können. Die Ziffern bezeichnen die Numerierung der Kohlenstoffatome im Gerüst, die für die Zuordnung der ¹H und ¹³C chemischen Verschiebungen der NMR-Analytik verwendet wurde.

Diese allgemeine Formel umfaßt verschiedene Substanzen, also polyzyklische Makrolactone, die mit besonderem Vorteil als Wirkstoff gegen

Mikroorganismen, insbesondere gegen Bakterien, eingesetzt werden können. Die Struktur dieser Substanzen, also der Abyssomicine, stellt eine neue Leitstruktur dar, anhand welcher die Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen vorgenommen werden kann.

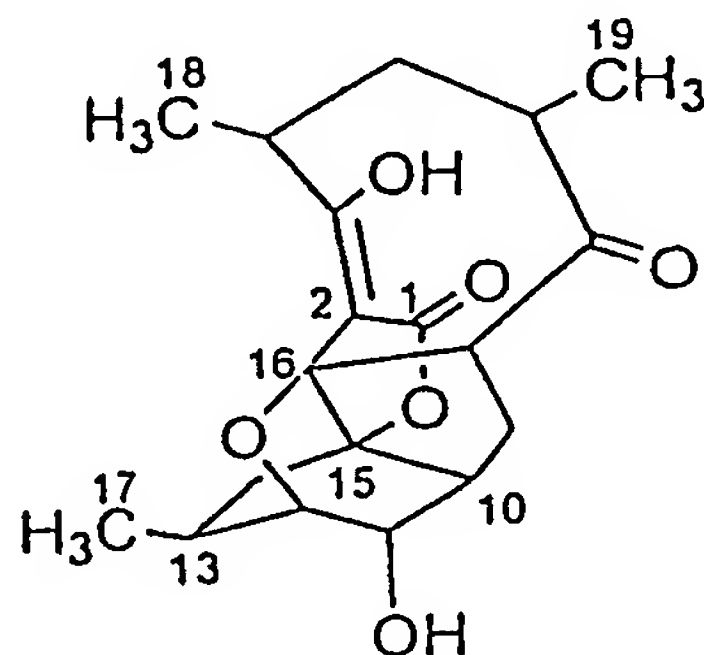
5

Eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Substanzen ist durch die folgende Formel II



15

darstellbar. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform läßt sich mit der Formel IV



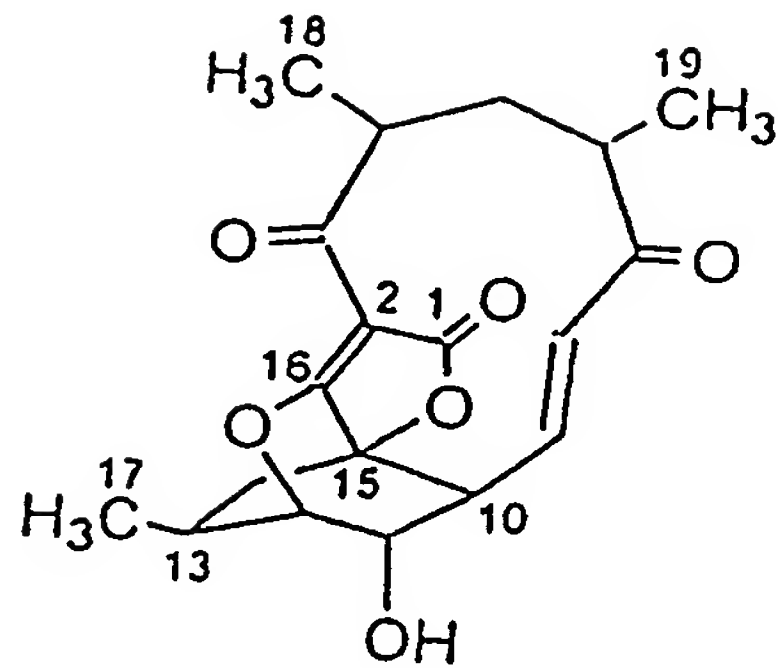
beschreiben.

25

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Substanzen ist durch die Formel III

30

(III)



gekennzeichnet. Insbesondere diese Ausführungsform ist durch besonders vorteilhafte antibiotische Eigenschaften gekennzeichnet, die sich insbesondere gegenüber Gram-positiven Bakterien auswirken. Die Substanz gemäß Formel II wird im folgenden als Abyssomicin B, die Substanz gemäß Formel III als Abyssomicin C und die Substanz gemäß Formel IV als Abyssomicin D bezeichnet.

Die Erfindung umfaßt weiterhin Substanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Biosynthese der para-Aminobenzoesäure (pABA) hemmen. Insbesondere hemmen diese erfindungsgemäßen Substanzen die Synthese der para-Aminobenzoesäure aus Chorisminsäure. Zur Veranschaulichung ist der Biosyntheseweg der para-Aminobenzoesäure aus Chorisminsäure auf der linken Seite der Fig. 4 dargestellt. Die para-Aminobenzoesäure ist ein essentieller Baustein der Folsäurebiosynthese, die auf der rechten Seite der Fig. 4 dargestellt ist. Die erfindungsgemäßen Substanzen hemmen also letztendlich die Folsäuresynthese. Hierbei handelt es sich um ein lebensnotwendiges Vitamin der Prokaryonten, so daß durch die erfindungsgemäßen Substanzen deren Stoffwechsel derart beeinträchtigt wird, daß die entsprechenden Mikroorganismen mit den erfindungsgemäßen Substanzen bekämpft werden können. Der besondere Vorteil dieses Angriffspunkts der erfindungsgemäßen Substanzen ist, daß Eukaryonten und insbesondere Säugetiere diesen Biosyntheseweg der Folsäure nicht besitzen, so daß eukaryontische Zellen von den erfindungsgemäßen Substanzen nicht negativ beeinflusst werden. Folglich können die erfindungsgemäßen Substanzen beispiels-

weise bei der Behandlung von Krankheiten, insbesondere von Infektionskrankheiten, im Menschen oder im Tier eingesetzt werden, ohne weitergehende Nebenwirkungen zu entfalten. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Substanzen weisen diese Substanzen 5 Merkmale gemäß der obigen Beschreibung auf.

Weiterhin umfaßt die Erfindung polyzyklische Makrolactone als Substanzen, die als Teilstrukturen mindestens ein Oxabicyclo-System und mindestens ein Michael-System als Doppelbindungssystem aufweisen. 10 Bei dem Michael-System handelt es sich vorzugsweise um eine *trans*-Doppelbindung, die sich in Konjugation mit einem Keton befindet. Besonders bevorzugt ist es, wenn sich dieses Michael-System beispielsweise an den Positionen C7 bis C9 eines Ringsystems gemäß der allgemeinen Formel I befindet. Versuche der Erfinder haben gezeigt, daß 15 ein solches Michael-System vorteilhafterweise direkt an dem Wirkungsmechanismus der erfindungsgemäßen Substanzen beteiligt sein kann, indem es beispielsweise mit nukleophilen Aminosäureseitenketten vorteilhafterweise irreversibel wechselwirkt. Das erfindungsgemäß in den polyzyklischen Makrolactonen enthaltende Oxabicyclo-System weist 20 Ähnlichkeiten mit der Lösungskonformation von Chorismat auf. Die entsprechenden Konformationen von Chorismat sind zur Erläuterung in Fig. 7 A dargestellt. Die erfindungsgemäßen Substanzen können daher in gewisser Weise das Substrat Chorismat nachahmen, so daß sich hierdurch die besondere Wirkung der erfindungsgemäßen Substanzen erklären läßt. Dieses Oxabicyclo-System kann beispielsweise so ausgestaltet sein, wie es sich aus den Formeln I bis IV ergibt. Besonders bevorzugt ist es, wenn sich ein solches Bicyclo-System in der Nähe des beschriebenen Michael-Systems befindet. Eine bevorzugte Ausführungsform einer solchen Substanz, die ein Michael-System und ein 30 Oxabicyclo-System aufweist, läßt sich beispielsweise durch die Formel III beschreiben.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn die Teilstruktur, die sich beispielhaft in den Formeln I bis IV an den Positionen C11 bis C12 befindet und Teil des Oxabicyclo-Systems ist, eine (S)-Konfiguration zeigt. Besonders bevorzugt ist es, wenn sich an der Position C11 ein sekundärer Alkohol befindet, der diese (S)-Konfiguration zeigt. Zur Erläuterung wird auf die Fig. 7 B verwiesen, welche Beispiele für die erfindungsgemäßen Substanzen in entsprechender Konfiguration zeigt, wobei die hier gezeigten Formeln von links nach rechts den Formeln II, III und IV entsprechen.

- 10 Weiterhin umfaßt die Erfindung Substanzen, die dadurch gekennzeichnet sind, daß es sich dabei um Derivate der oben beschriebenen polyzyklischen Makrolactone handelt. Bei diesen Substanzen kann es sich um natürlich vorkommende Substanzen handeln. Andererseits werden
- 15 hiervon auch Substanzen umfaßt, die zumindest zum Teil synthetisch oder auch mit anderen Mitteln hergestellt sind und beispielsweise von natürlich vorkommenden Substanzen abgeleitet sein können. So können beispielsweise die oben beschriebenen Substanzen als Leitstrukturen verwendet werden, um entsprechend geeignete Substanzen, die möglicherweise gegenüber den Ausgangssubstanzen weitere Vorteile aufwei-
- 20 sen, zu entwerfen und herzustellen. Hierbei kann es sich vorteilhafterweise um antibiotisch wirksame Substanzen handeln, die ähnliche oder verbesserte antibiotische Wirksamkeit wie die Ausgangssubstanz haben, die aber beispielsweise bezüglich Nebenwirkungen in einem Organismus oder Bioverfügbarkeit in einem Organismus bessere Eigenschaften aufweisen als die Ausgangssubstanzen. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Substanzen wird auf die obige Beschreibung verwiesen.
- 25

- In einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, welche mindestens eine Substanz gemäß der obigen Beschreibung und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger aufweisen. Insbesondere umfaßt die Erfindung pharmazeutische
- 30

Zusammensetzungen, welche neben mindestens einem pharmazeutisch akzeptablen Träger mindestens eine Substanz aufweisen, welche die Biosynthese der para-Aminobenzoessäure hemmt, und insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoessäure aus Chorisminsäure hemmt. Mit diesen pharmazeutischen Zusammensetzungen können vorteilhafterweise Mikroorganismen und insbesondere Bakterien bekämpft werden.

Besonders vorteilhaft sind diese pharmazeutischen Zusammensetzungen für die Behandlung von Infektionskrankheiten verwendbar, welche durch Bakterien verursacht sind oder zumindest durch Bakterien beeinflusst werden. Ganz besonders bevorzugt ist es, wenn diese pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Bekämpfung von Gram-positiven Bakterien eingesetzt werden. Die besonders vorteilhafte Wirkung dieser pharmazeutischen Zusammensetzungen bzw. der entsprechenden Substanzen beruht vor allem darauf, daß durch diese Substanzen die Biosynthese der Folsäure letztendlich gehemmt wird. Dieser Stoffwechselweg ist nur in den zu bekämpfenden Bakterien und nicht in Tieren oder Menschen vorhanden, welche mit diesen Zusammensetzungen behandelt werden können. Besonders vorteilhaft können hiermit klinisch-pathogene Bakterien bekämpft werden, insbesondere pathogene multiresistente Bakterien, die auf herkömmliche Antibiotika nicht mehr ansprechen. Mit sehr großem Vorteil sind die pharmazeutischen Zusammensetzungen zur Behandlung von Infektionskrankheiten geeignet, die durch Gram-positive Bakterien zumindest mitbeeinflusst werden. Beispielsweise sind mit den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen multiresistente und insbesondere Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) bekämpfbar. Es können beispielsweise auch Infektionskrankheiten behandelt werden, bei welchen *Staphylococcus aureus*-Stämme beteiligt sind, die neben verschiedenen anderen Resistenzen auch gegen Vancomycin resistent sind. Resistenzen gegenüber Vancomycin sind bereits verschiedentlich diagnostiziert worden. Eine Behandlung mit den erfindungsgemäßen pharmazeuti-

schen Zusammensetzungen kann insbesondere in einem solchen Fall den Patienten vor dem Tod bewahren, da es ansonsten keine Therapiemöglichkeit für derartige super-multiresistente Stämme gibt. Selbstverständlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen auch
5 für die Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen eingesetzt werden, die keine oder nur wenige Resistenzen gegenüber herkömmlichen Antibiotika entwickelt haben.

Die Erfindung umfaßt auch die Verwendung der oben beschriebenen
10 Substanzen zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind. Die Erfindung umfaßt außerdem die
15 Verwendung von Substanzen zur Behandlung der genannten Infektionskrankheiten, wobei die Substanzen die Synthese der para-Aminobenzoessäure hemmen und insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoessäure aus Chorisminsäure hemmen. Die Verwendung entsprechender Substanzen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von
20 Infektionskrankheiten, die von Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind, werden ebenfalls umfaßt. Ferner umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Infektionskrankheiten, welche durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind, wobei mindestens eine Substanz in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung gemäß der obigen Beschreibung
25 verabreicht wird. Bezüglich weiterer Merkmale dieser verschiedenen Verwendungen und Verfahren wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien, wobei mindestens eine der
30 erfindungsgemäßen Substanzen, die oben beschrieben sind, verwendet wird. Bei einer solchen Bekämpfung von Mikroorganismen kann es sich

beispielsweise um ein Desinfektionsverfahren handeln. Insbesondere im Krankenhaus oder in anderen medizinischen Einrichtungen ist es unbedingt erforderlich, daß Oberflächen verschiedenster Art, wie beispielsweise Oberflächen von Operationsbesteck oder von Einrichtungsgegenständen, entkeimt werden, um eine Infektion mit krankheitserregenden Mikroorganismen zu verhindern. Die erfindungsgemäßen Substanzen können in diesem Zusammenhang sehr vorteilhaft eingesetzt werden, dies geschieht besonders bevorzugt in Kombination mit anderen desinfizierenden Mitteln.

10

Die Erfindung umfaßt ferner einen Mikroorganismus, der dadurch gekennzeichnet ist, daß er mindestens eine Substanz produzieren kann, wie sie oben beschrieben ist. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Mikroorganismus um ein Bakterium, wobei die-

15

ses Bakterium vorzugsweise ein Vertreter der Gattung *Verrucosispora* ist. Besonders bevorzugt ist es, daß es sich hierbei um den Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) handelt. Bei dem Bakterienstamm AB 18-032 handelt es sich um den Stamm, aus welchem die Erfinder die beispielhaft aufgeführten Substanzen isolieren konnten. Mutanten dieser

20

Mikroorganismen und insbesondere des Stammes AB 18-032 werden ebenfalls von der Erfindung umfaßt. Die Erfindung umfaßt auch andere Mikroorganismen, die entsprechende Substanzen produzieren. Besonders bevorzugt sind hierbei Mikroorganismen, die beispielsweise größere Mengen der erfindungsgemäßen Substanzen produzieren können.

25

Mit diesen Mikroorganismen können mit besonderem Vorteil die Mengen der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellt werden, die für therapeutische Einsätze erforderlich sind.

30

Schließlich umfaßt die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung mindestens einer erfindungsgemäßen Substanz, wobei hier zunächst ein Mikroorganismus kultiviert wird, der in der Lage ist, mindestens eine der beschriebenen Substanzen zu produzieren. Bevorzugterweise wird die

Substanz von dem Mikroorganismus nach außen abgegeben, so daß in einem nächsten Verfahrensschritt ein Filtrat des Kulturüberstands hergestellt wird, in welchem sich die gewünschte Substanz befindet. Dieses Kulturfiltrat oder auch der Kulturüberstand kann direkt verwendet werden, um die erfindungsgemäßen Substanzen entsprechend einzusetzen. Andererseits können die Substanzen auch aus dem Kulturfiltrat oder dem Kulturüberstand isoliert und vorzugsweise mehr oder weniger gereinigt werden, um so die Substanz in gereinigter Form zur Verfügung zu haben. Dies ist vor allem für medizinische Anwendungen vorteilhaft, da für den pharmazeutischen Einsatz möglichst nur gereinigte Substanzen zu verwenden sind, um unerwünschte Wirkungen anderer Stoffe zu vermeiden. Als Mikroorganismus wird vorteilhafterweise der Stamm AB 18-032 verwendet. Es kann jedoch auch sehr vorteilhaft sein, einen Mikroorganismus einzusetzen, der beispielsweise hinsichtlich der Menge der zu produzierenden Substanz optimiert ist. Eine entsprechende Optimierung kann beispielsweise durch entsprechende Selektion erfolgen. Die Kultivierung des Mikroorganismus erfolgt vorzugsweise in Gegenwart von einem Medium, welches mindestens eine Kohlenstoffquelle, Stickstoffquelle und Mineralsalze enthält. Die anschließende Gewinnung der Substanzen erfolgt bevorzugt aus dem Kulturfiltrat, kann jedoch auch direkt aus dem Kulturüberstand erfolgen. Die Substanzen können aus dem Kulturfiltrat oder dem Überstand beispielsweise durch Lösungsmittlextraktion (z. B. Ethylacetat) isoliert werden. Eine andere Möglichkeit ist beispielsweise eine Säulenchromatographie mit einem Polystyrolharz (z. B. Amberlite XAD-16). Eine weitere Isolierung oder Reinigung kann durch Auftrennung der verschiedenen Substanzen durch beispielsweise Absorptions- und/oder Ausschlußchromatographie erfolgen. Durch eine Kristallisation können die Substanzen in reiner Form gewonnen werden. Gegebenenfalls können die gereinigten Substanzen mit gängigen chemischen Verfahren weiter umgesetzt werden. Einzelheiten zu diesem Herstellungsverfahren erschließen sich dem Fachmann ohne weiteres.

Einzelheiten zu den beschriebenen Merkmalen sowie weitere Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung von Beispielen in Verbindung mit den Figuren und den Unteransprüchen. Hierbei können die einzelnen Merkmale jeweils für sich oder in Kombination
5 miteinander verwirklicht sein.

In den Figuren zeigen:

- 10 Fig. 1 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Stammes AB 18-032,
- Fig. 2 Sequenz des Gens der 16S rRNA des Stammes AB 18-032 (SEQ ID No. 1),
- 15 Fig. 3 Position des Stammes AB 18-032 im phylogenetischen Stammbaum der Unterordnung *Mikromonosporineae* (Stammbaum nach Saitou, N. & M. Nei (1987), Mol. Biol. Evol. 4: 406-425),
- 20 Fig. 4 Biosyntheseweg der para-Aminobenzoesäure (links) und der Folsäure (rechts),
- Fig. 5 UV-Spektren der Abyssomicine gemäß den Formeln II, III und IV,
- 25 Fig. 6 minimale Hemmkonzentration der Substanz gemäß Formel III (Abyssomicin C) gegen die multiresistenten Stämme *Staphylococcus aureus* N135 und *Staphylococcus aureus* Mu50,
- 30 Fig. 7 (A) diaxiale Konformation von Chorismat in wäßriger Lösung; (B) Konfigurations-Strukturformeln der Substanzen gemäß den Formeln II, III und IV.

Beispiele1. Screening nach Hemmstoffen der Biosynthese der Chorisminsäure, der *para*-Aminobenzoesäure (*p*ABA) und der aromatischen Aminosäuren

Hemmstoffe der Chorisminsäurebiosynthese und der Biosynthesewege, die sich von der Chorisminsäure ableiten, werden sich mit einem sogenannten Kreuztest ermittelt, der auf einem modifizierten Agardiffusionstest beruht. Als Testorganismus wird *Bacillus subtilis* verwendet, der in einem chemisch-definierten Agarmedium eingegossen wird. Der eine Filterpapierstreifen des Kreuztestansatzes wird mit einem Zellextrakt getränkt, der zweite Filterpapierstreifen mit folgender Variation: (a) Tyr + Phe + Trp + *p*ABA, (b) Tyr + Phe, (c) Trp und (d) *p*ABA. Nach dem Muster der Aufhebung der einzelnen Varianten kann entschieden werden, ob es sich um einen Hemmstoff der frühen Aromatenbiosynthese handelt (vor der Chorisminsäure) oder um einen Hemmstoff, der nach der Chorisminsäure eingreift, und ob es sich hierbei um einen Hemmstoff der Tyrosin (Tyr)/Phenylalanin (Phe)-Biosynthese, der Tryptophan (Trp)-Biosynthese oder der *para*-Aminobenzoesäure (*p*ABA)-Biosynthese handelt. Nur der Extrakt, dessen Hemmwirkung durch (a) und (d) antagonisiert wird, enthält einen Antagonisten der *p*ABA, der die *p*ABA-Biosynthese nach der Chorisminsäure hemmt. Mit diesem Test wurde der Stamm AB 18-032 gefunden, der die wirksamen Substanzen produziert.

2. Produktion der polyzyklischen Makrolactone durch den Bakterienstamm AB 18-032

Die polyzyklischen Makrolactone werden vom Stamm AB 18-032 während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase pro-

duziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 10-Liter-Blattrührfermenter wird mit 9,5 Liter Komplexmedium (1 % Glucose, 1 % Stärke, 1 % Glycerin, 0,25 % Corn Steep Powder, 0,5 % Pepton, 0,2 % Hefeextrakt, 0,1 % NaCl, 0,3 % CaCO₃; pH 7,3) gefüllt. Der Fermenter wird mit 5 Volumen-% einer 48-stündigen Schüttelkultur (500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich, 100 ml Komplexmedium, 120 Upm, 27 °C) angeimpft. Der Fermenter wird bei 27°C, einer Drehzahl von 200 Upm und einer Belüftung von 0,5 vvm 4-5 Tage inkubiert. Die polyzyklischen Makrolactone sind mit HPLC-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) und biologischer Testierung im Kulturüberstand nachweisbar.

3. Isolierung der polyzyklischen Makrolactone

15

Die Fermenterbrühe wird unter Zusatz von 2 % Filterhilfsmittel (Hyphlo-Supercel) in Biomasse und Kulturfiltrat getrennt. Die Biomasse wird verworfen. Das Kulturfiltrat wird auf pH 4 eingestellt (HCl) und 2 x mit je ¼ Volumen Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer bis zum öligen Rückstand konzentriert. Der ölige Rückstand wird 2 x mit einem kleinen Volumen Petroleumbenzin extrahiert, um Fette zu entfernen. Der Petroleumbenzin-Extrakt wird verworfen.

25 Der ölige Rückstand wird in wenig Methanol gelöst und an einer Sephadex LH-20-Säule (100 x 5 cm) in Methanol in die einzelnen Substanz-Rohfraktionen aufgetrennt. Die Isolierung von reinen polyzyklischen Makrolactonen erfolgt durch Niederdruck-Chromatographie an einer LiChroprep Diol-Säule (40 x 2,6 cm) und einem linearen Gradienten von 30 Dichlormethan zu Dichlormethan/Methanol (90+10) in 3 Stunden bei einem Fluß von 2 ml/min, und einer nachfolgenden Ausschluß-Chroma-

tographie an einer Fractogel TSK HW 40-Säule (90 x 2,5 cm) in Methanol bei einem Fluß von 0,5 ml/min.

5 4. HPLC-DAD-Analytik der polyzyklischen Makrolactone

Chromatographische Ausstattung: HP 1090 Liquid Chromatograph mit integriertem Diodenarray-Detektionssystem und HP Kayak XM 600-ChemStation mit HPLC-Software A.08.03 (Agilent Technologies). Die Mehrkanaldetektion erfolgte bei 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 und 500 nm, die UV-Vis-Spektren wurden bei 200-600 nm registriert.

Trennparameter: HPLC-Säule gefüllt mit Nucleosil-100 C-18 (125 x 4,6 mm, Vorsäule 20 x 4,6 mm, Korngröße 5 µm; Macherey & Nagel). Lineare Gradientenelution von 100 % wäßriger Phosphorsäure (0,1 % v/v) zu 100 % Acetonitril in 15 min bei einem Fluß von 2 ml/min. Das Injektionsvolumen beträgt 10 µl. Die Retentionszeiten betragen für Abyssomicin B 6,7 min, Abyssomicin C 7,35 min, Abyssomicin D 9,0 min. Neben den Retentionszeiten werden die Abyssomicine anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert (Fig. 5).

5. Strukturaufklärung

LC-MS-Experimente: Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies) gekoppelt an Bruker Esquire 3000+-Massenspektrometer (Bruker-Daltonics).

ESI-FTICR-MS: Die Massenspektren wurden auf einem APEX II FTICR Massenspektrometer (4.7 T; Bruker-Daltonics) aufgenommen. Zur internen Kalibrierung wurden PEG 400 verwendet.

$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR Experimente (1D: ^1H , 2D: COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) wurden auf einem AMX 600 NMR-Spektrometer (Bruker) mit 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit Z-Gradienten durchgeführt.

5

6. Physiko-Chemische Eigenschaften

Die isolierten Substanzen zeigten folgende physiko-chemischen Eigenschaften:

10

Abyssomicin B:

farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_7$ [377]

15 ESI-FTICR-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 400.13654 \text{ Da}$ ($[\text{M}+\text{Na}]_{\text{theor.}}^+ = 400.13667 \Delta m = 0.34 \text{ ppm}$; $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_7\text{Na}$)

^1H -NMR- / ^{13}C -NMR-Daten: siehe Tabelle 3

20 Tabelle 3: ^1H - und ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin B ($[\text{D}_6]$ DMSO, 305 K); Kopplungskonstanten nicht bestimmt

25

30

No.	^1H δ [ppm]	^{13}C δ [ppm]
1	-	169.4
2	-	99.7
3	-	212.6
4	3.18	41.9
5	2.59 (a) 2.59 (b)	34.8
6	2.14	43.7
7	-	197.1
8	1.33 (a) 1.77 (b)	38.5
9	-	n.b.
10	2.59	45.8
11	4.24 5.82 (OH)	68.9 -
12	4.55	84.5
13	2.55	24.2
14	2.54 (a) 1.04 (b)	36.9
15	-	78.0
16	-	184.5
17	0.99	18.7
18	0.97	16.6
19	0.96	20.1

n.b. = nicht bestimmt

Abyssomicin C

5 farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

Summenformel: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ [346]

ESI-FTICR-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 369.13079$ Da ($[\text{M}+\text{Na}]_{\text{ther.}}^+ = 369.13085$ Δm
= 0.20 ppm; $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_6\text{Na}$)

^1H -NMR- / ^{13}C -NMR-Daten: siehe Tabelle 4

10

Tabelle 4: ^1H - und ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin C ($[\text{D}_4]\text{MeOD}$, 298 K)

No.	^1H δ [ppm]	Kopplungskonstanten [Hz]	^{13}C δ [ppm]
1	-	-	173.8
2	-	-	106.7
3	-	-	202.8
4	3.51	m $^3J_{4,18} = 6.7$; $^3J_{4,5a} = 11.2$; $^3J_{4,5b} = 2.7$	45.3
5	2.01 (a)	m $^2J_{5a,5b} = 14.1$; $^3J_{5a,4} = 11.2$; $^3J_{5a,6} = 10.1$	42.3
	1.44 (b)	m $^2J_{5b,5a} = 14.1$; $^3J_{5b,4} = 2.7$; $^3J_{5b,6} = 1.6$	
6	2.94	m $^3J_{6,5a} = 10.1$; $^3J_{4,5b} = 1.6$; $^3J_{6,19} = 7.2$	50.3
7	-	-	208.4
8	6.55	m $^3J_{8,9} = 13.5$	137.1
9	5.98	dd $^3J_{9,8} = 13.5$; $^3J_{9,10} = 9.5$	137.3
10	2.99	dd $^3J_{10,9} = 9.5$; $^3J_{10,11} = 6.1$	51.5
11	5.06	dd $^3J_{11,10} = 6.1$; $^3J_{11,12} = 3.3$	76.0
	4.59 (OH)	-	-
12	4.57	d $^3J_{12,11} = 3.3$; $^3J_{12,13} = \text{n.b.}$	88.9
13	2.73	n.b.	28.1
14	1.26 (a)	dd $^2J_{14a,14b} = 12.4$; $^3J_{14a,13} = 23.9$	39.6
	2.69 (b)	dd $^2J_{14b,14a} = 12.4$; $^3J_{14b,13} = 2.4$	
15	-	-	81.1
16	-	-	189.8
17	1.17	d $^3J_{17,13} = 17.0$	21.5
18	1.09	d $^3J_{18,4} = 6.7$	19.3
19	1.11	d $^3J_{19,6} = 7.2$	23.0

n.b. = nicht bestimmt

Abyssomicin D:

5 farblose Substanz, löslich in Methanol und DMSO

Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6$ [348]

ESI-FTICR-MS: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 371.14663$ Da ($[\text{M}+\text{Na}]_{\text{theor.}}^+ = 371.14650$ Δm
 $= 0.32$ ppm; $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_6\text{Na}$)

^1H -NMR- / ^{13}C -NMR-Daten: siehe Tabelle 5

10

Tabelle 5: ^1H - und ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen von Abyssomicin D ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, 305 K)

No.	^1H δ [ppm]	Kopplungskonstanten [Hz]	^{13}C δ [ppm]
1	-	-	172.9
2	-	-	98.0
3	-	-	178.9
	11.04 (OH)	-	-
4	2.42	m n.b.	39.5
5	1.59 (a)	dd $^2J_{5a,5b} = 15.0$; $^3J_{5a,4} = \text{n.b.}$; $^3J_{5a,6} = \text{n.b.}$	32.5
	2.70 (b)	dd $^2J_{5b,5a} = 15.0$; $^3J_{5b,4} = \text{n.b.}$; $^3J_{5b,6} = \text{n.b.}$	
6	2.14	m n.b.	47.3
7	-	-	210.3
8	3.57	t $^3J_{8,9a} = 8.03$; $^3J_{8,9b} = 9.8$	57.8
9	1.54 (a)	dd $^3J_{9a,9b} = 12.0$; $^3J_{9a,8} = 8.03$; $^3J_{9b,10} = \text{n.d.}$	26.1
	2.00 (b)	m $^3J_{9b,9a} = 12.0$; $^3J_{9b,10} = 3.5$; $^3J_{9b,8} = 9.8$	
10	2.26	d $^3J_{10,9b} = 3.5$; $^3J_{10,11} = \text{n.b.}$; $^3J_{10,9a} = \text{n.b.}$	47.5
11	4.09	d $^3J_{11,12} = 4.0$; $^3J_{11,10} = \text{n.d.}$	72.1
	5.53 (OH)	-	-
12	3.54	d $^3J_{12,11} = 4.0$; $^3J_{12,13} = \text{n.b.}$	76.0
13	2.46	m n.b.	23.7
14	2.29 (a)	dd n.b.	31.8
	0.91 (b)	dd n.b.	
15	-	-	86.9
16	-	-	84.5
17	0.93	d $^3J_{17,13} = 6.8$	18.0
18	1.27	d $^3J_{18,4} = 7.4$	18.7
19	1.01	d $^3J_{19,6} = 7.1$	18.3

n.b. = nicht bestimmt

7. Antibiotische Aktivität im Agardiffusionstest und Wirkspektrum

5

Abyssomicin C zeigt im Agardiffusionstest eine antibiotische Wirkung, die sich vor allem gegen die getesteten Gram-positiven Bakterien richtet. Die getesteten Gram-negativen Bakterien und Pilze waren gegenüber den Abyssomicinen unempfindlich. Das antibiotische Wirkspektrum ist in

10 Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Antibiotische Aktivität von Abyssomicin C im Agardiffusionstest (10 µl Antibiotikumlösung pro Filterrondelle; Hemmzonendurchmesser in mm)

Testorganismus	Medium	Abyssomicin C (mg/ml)		
		1	0,3	0,1
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20166	KM	14	10	-
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30	KM	17	12	9
<i>Brevibacillus brevis</i> DSM 30	MM	30	24	19
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	KM	16	12	10
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	MM	26	19	14
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 381	KM	-	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM 750	KM	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	KM	19	11	9
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	KM	27	18	15
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	MM	30	28	21
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> Tü 57	KM	11	9	-

5 KM, Komplexmedium; MM, chemisch-definiertes Medium

8. Minimale Hemmkonzentration

- 10 Die minimale Hemmkonzentration (MIC) von Abyssomicin C wurde in einem Verdünnungsreihentest ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt. Die Testkeime sind in chemisch-definierten Medium erwartungsgemäß wesentlich empfindlicher gegenüber Abyssomicin C.

Tabelle 7: Minimale Hemmkonzentration (MIC; $\mu\text{g/ml}$) von Abyssomicin C im Verdünnungsreihentest (2 ml-Reagenzglasmaßstab, Schüttelmaschine 120 Upm).

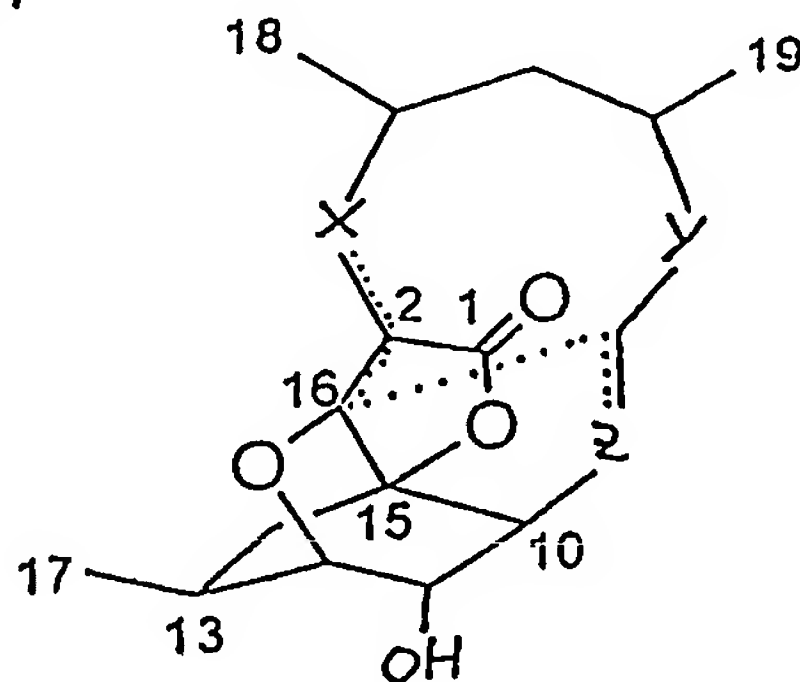
Testorganismus	Medium	MIC
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	KM	10
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 10	MM	0,1
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM 1069	KM	10
<i>Staphylococcus aureus</i> DSM 20231	KM	100

Die Ermittlung der MIC gegenüber klinisch pathogenen *Staphylococcus aureus*-Stämmen wurden in einem Mikrotiterplattenassay durchgeführt. Es wurde die Wirksamkeit von Abyssomicin C gegenüber dem multiresistenten, einschließlich Methicillin-resistenten Stamm *S. aureus* N315 sowie gegenüber dem multiresistenten, einschließlich Vancomycin-resistenten Stamm *S. aureus* Mu50 ermittelt. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 dargestellt.

Patentansprüche

1. Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein polyzyklisches Makrolacton ist und von einem Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosisspora* herstellbar ist.
2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie pharmakologische Wirkung, insbesondere antibiotische Wirkung, aufweist.
3. Substanz nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie antibiotische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien aufweist.
4. Substanz nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosisspora* der Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) ist.
5. Substanz, insbesondere nach einem der Ansprüche 1 bis 4, durch die allgemeine Formel I

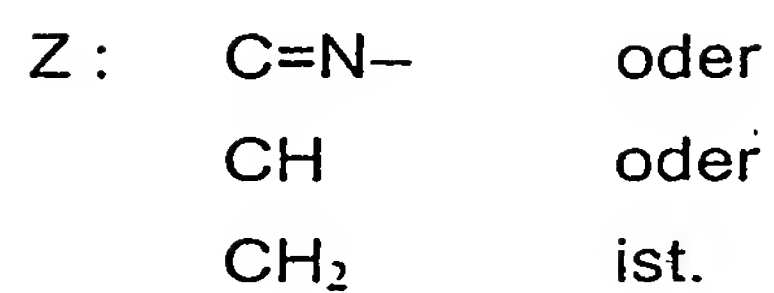
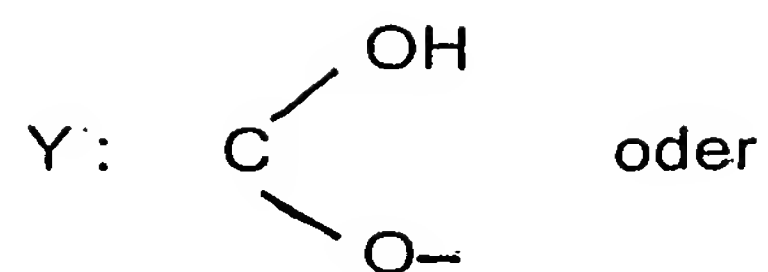
(I)



gekennzeichnet, wobei

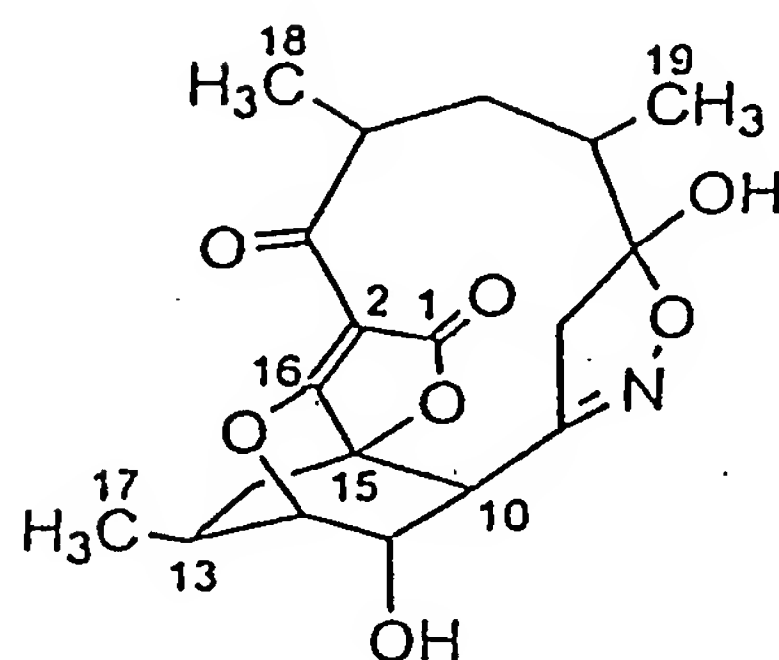
X : C=O
C-OH

oder



6. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel II

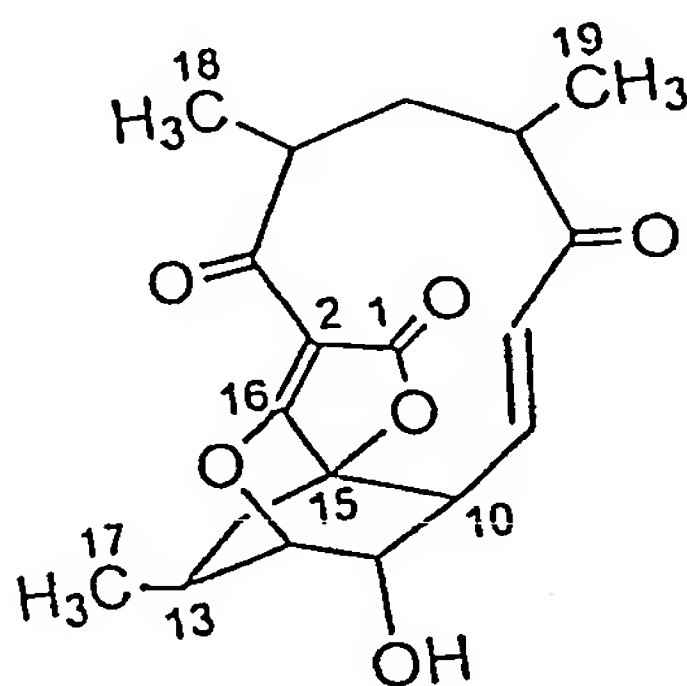
(II)



gekennzeichnet.

7. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel III

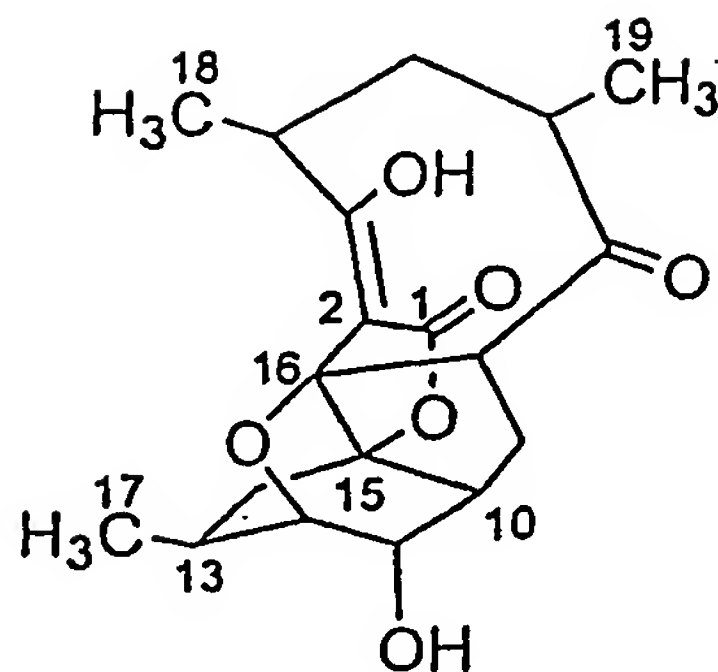
(III)



gekennzeichnet.

8. Substanz nach Anspruch 5, durch die Formel IV

(IV)



gekennzeichnet.

9. Substanz, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Synthese der para-Aminobenzoesäure hemmt, insbesondere die Synthese der para-Aminobenzoesäure aus Chorisminsäure.
10. Substanz, insbesondere nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein polyzyklisches Makrolacton ist und als Teilstrukturen mindestens ein Oxabicyclo-System und mindestens ein Michael-System als Doppelbindungssystem aufweist.
11. Substanz, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Derivat eines polyzyklischen Makrolactons gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche ist.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Substanz gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.
13. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens eine Substanz, die die Synthese der para-

Aminobenzoessäure aus Chorisminsäure hemmt, und mindestens einen pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt.

14. Verwendung einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind.
15. Verwendung einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind.
16. Verwendung einer Substanz zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz die Synthese der para-Aminobenzoessäure aus Chorisminsäure hemmt.
17. Verwendung einer Substanz zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Infektionskrankheiten, die durch Bakterien zumindest mitbeeinflußt sind, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanz die Synthese der para-Aminobenzoessäure aus Chorisminsäure hemmt.
18. Verwendung nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 eingesetzt wird.
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien zumindest teilweise Gram-positive Bakterien sind.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien gegenüber herkömmlichen Antibiotika resistent, insbesondere multiresistent, sind.
21. Verfahren zur Bekämpfung von Mikroorganismen, insbesondere von Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 verwendet wird.
22. Mikroorganismus, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 produzieren kann.
23. Mikroorganismus nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Bakterienstamm der Bakteriengattung *Verrucosispora* oder eine Mutante davon ist.
24. Mikroorganismus, insbesondere nach Anspruch 22 oder Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß er der Bakterienstamm AB 18-032 (DSM 15899) der Bakteriengattung *Verrucosispora* oder eine Mutante davon ist.
25. Verfahren zur Herstellung mindestens einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend die Verfahrensschritte:
 - a) Kultivieren eines Mikroorganismus gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24,
 - b) Gewinnung eines Kulturüberstandes aus der Kultivierung,
 - c) gegebenenfalls Herstellen eines Kulturfiltrates und
 - d) gegebenenfalls Isolieren einer oder mehrerer Substanzen aus dem Kulturüberstand und/oder dem Kulturfiltrat.

- - - - -

Zusammenfassung

Es werden neue polyzyklische Makrolactone bereitgestellt, die insbesondere von einem Vertreter der Bakteriengattung *Verrucosispora* herstellbar sind. Diese Substanzen zeichnen sich vorzugsweise durch ihre pharmakologische Wirkung aus. Insbesondere weisen sie antibiotische Wirkung auf. Bevorzugterweise tritt diese antibiotische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien ein.

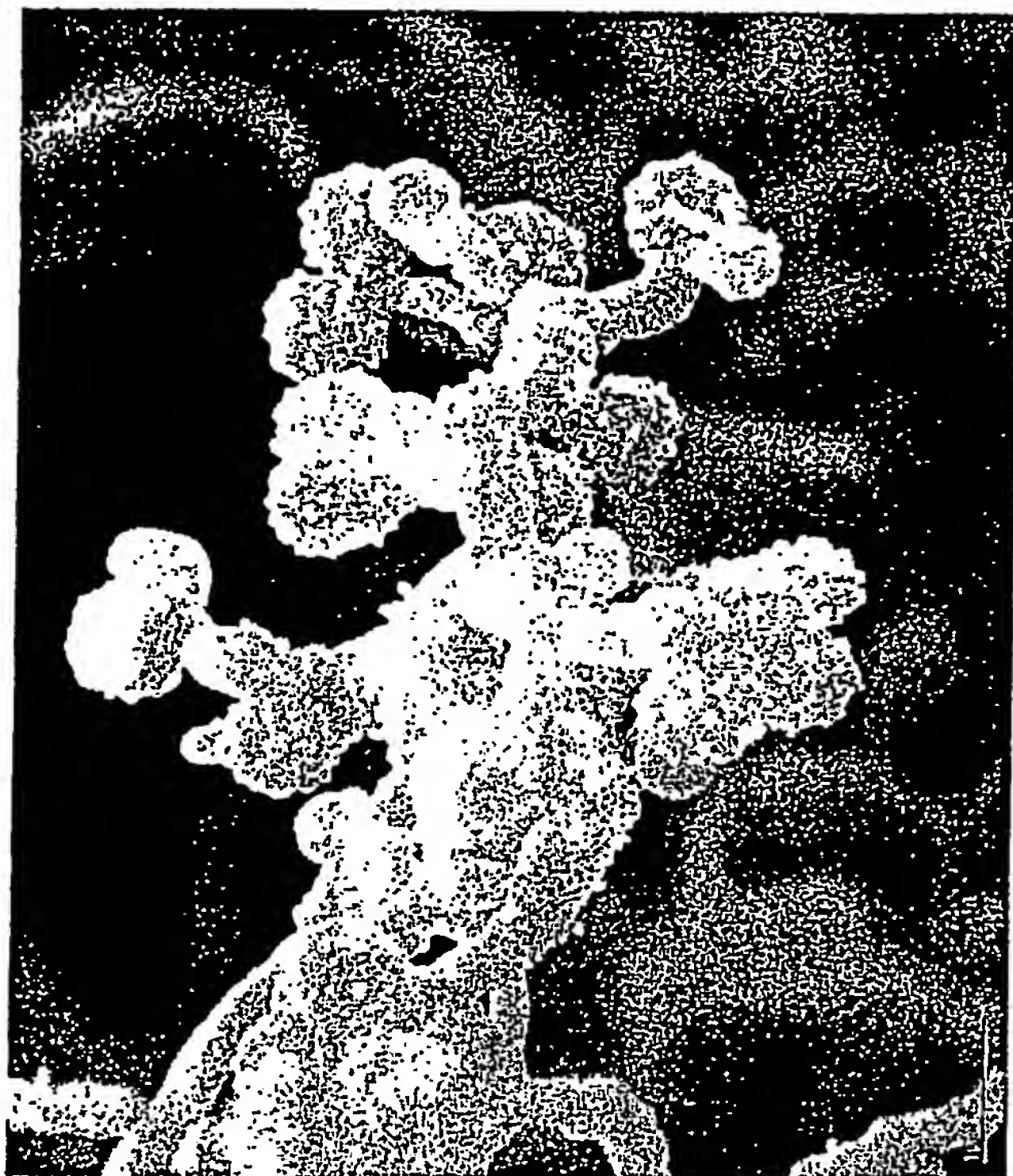


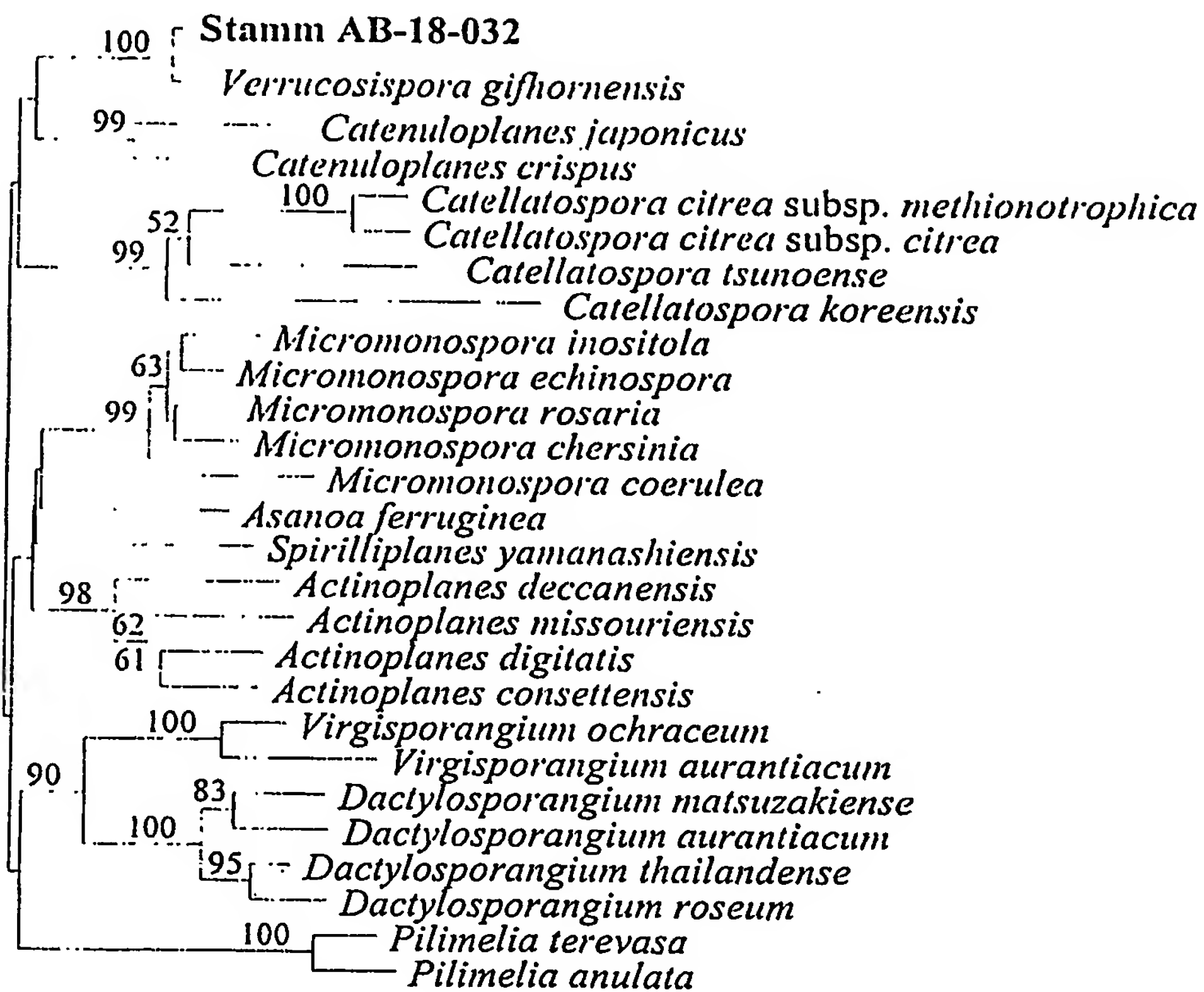
Fig. 1

BEST AVAILABLE COPY

CAAGTCGAGCGGAAAGGCCCTTCGGGGTACTCGAGCGGCGAACGGGTGAG
TAACACGTGAGCAACCTGCCCTAGGCTTTGGGATAACCCTCGGAAACGGG
GGCTAATACCGAATATTCACACGGGCGCATGTTTGTGGGTGGAAAGTT
TTTCGGCTTGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATG
GCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACA
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC
GGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGACGAAGCGCAAGTGACGG
TACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGA
CGTAGGGCGCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGAACTCGTAGG
CGGCTTGTCGCGTCGACTGTGAAAACCCGTGGCTCAACTGCGGGCCTGCA
GTCGATACGGGCAGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTG
TAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGG
TCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGTTGGGCGCTAGGTGTGG
GGGGCCTCTCCGGTTCTCTGTGCCGAGCTAACGCATTAAGCGCCCCGCC
TGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
CACAAACGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTA
CCTGGGTTTGACATCGCCGGAATCCTGCAGAGATGTGGGGTCCTTCGGG
GCCGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTCCCATGTTGCCAGCAATT
CGGTTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAGTCATCATGCCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
CAATGGCCGGTACAATGGGCTGCGATACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCAA
AAAGCCGGTCTCAGTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTC
GGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACGTACGAAAGTCGGCAACACCCGAAG
CCGGTGGCCCAACCCTTGTGGAGGGAGCCGTGGAAGGTGGGGCTGGCGAT
TGGGACGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGC

Fig. 2

0,02 substitutions/site

Fig. 3

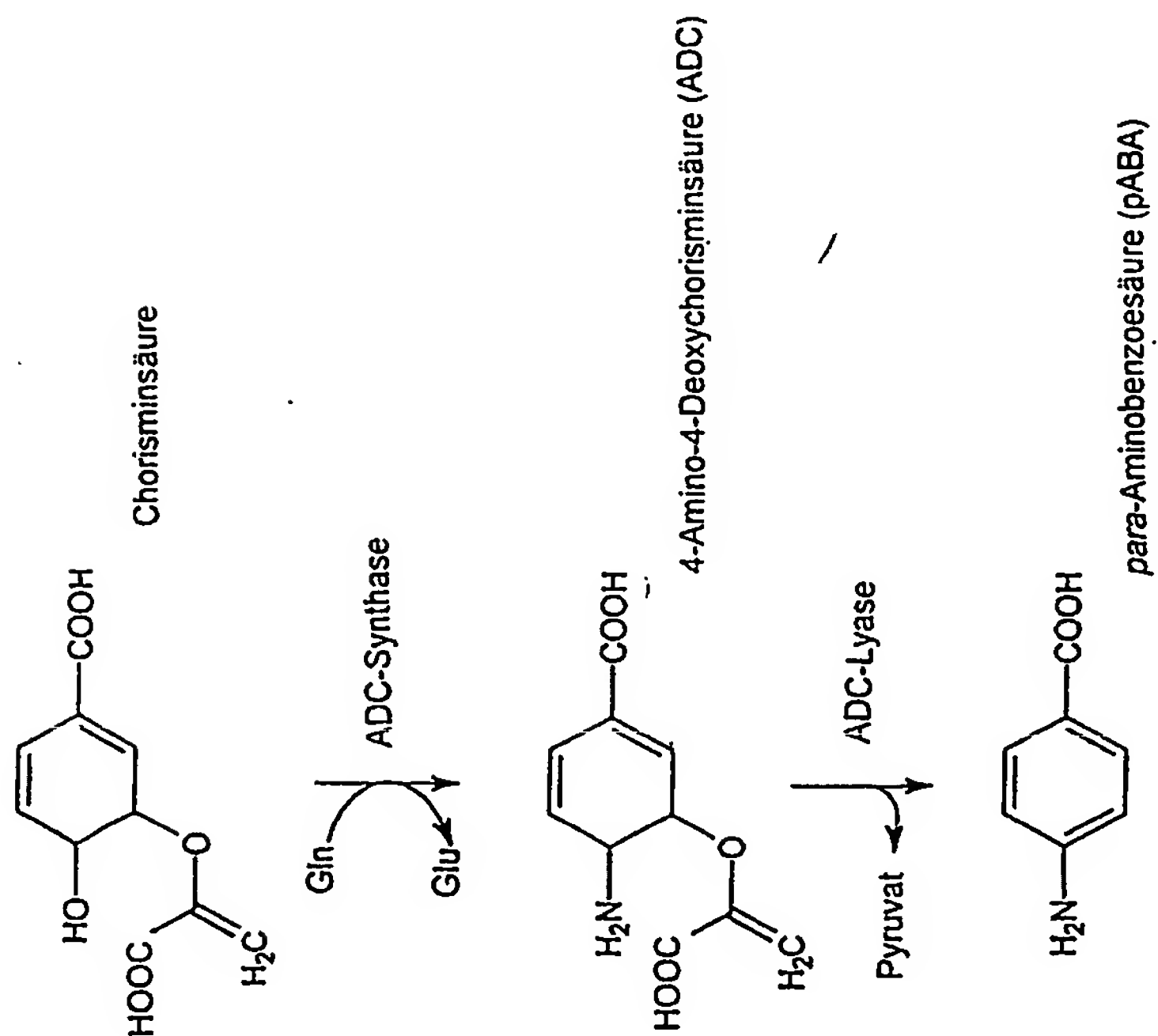
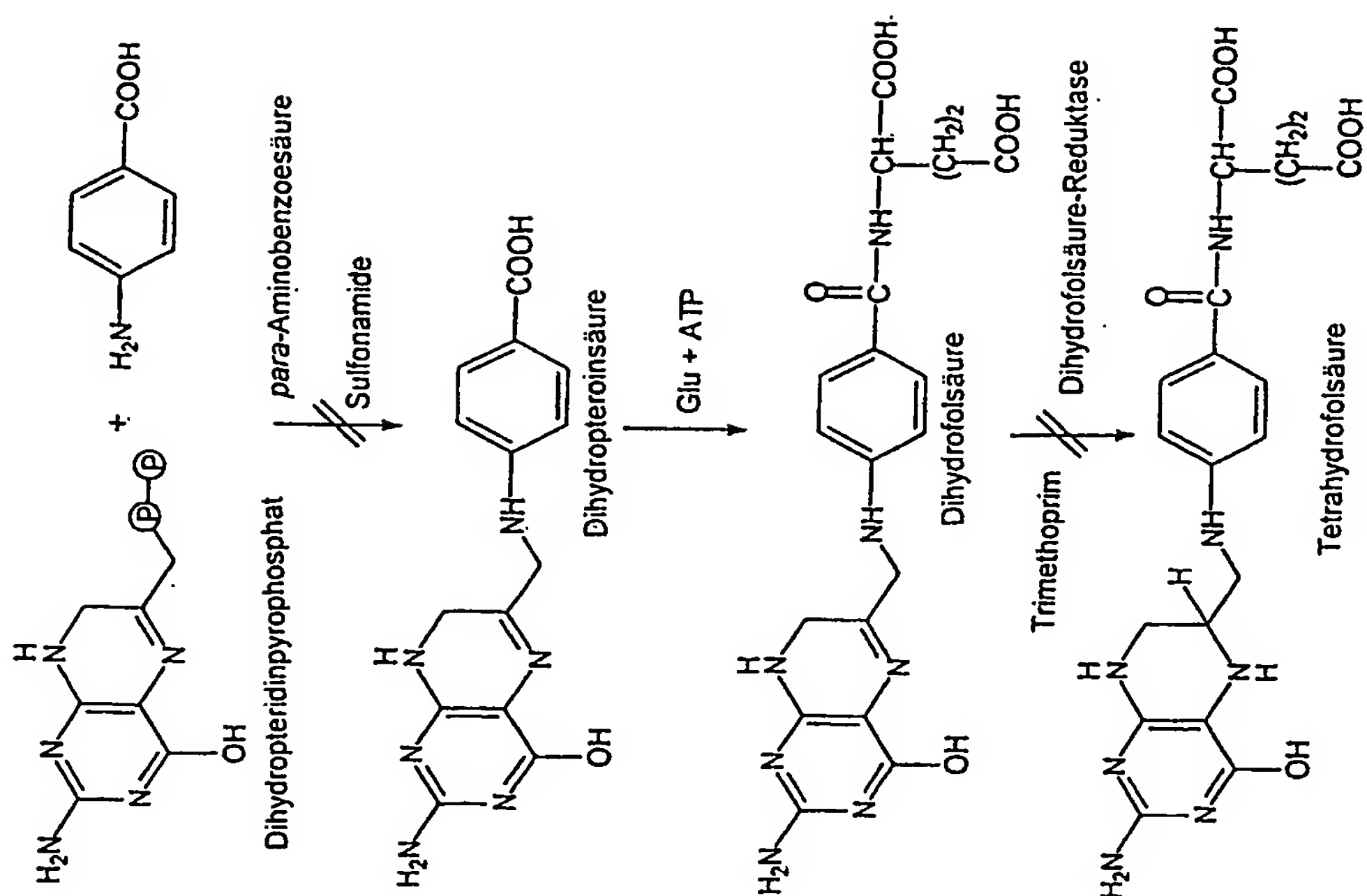


Fig. 4

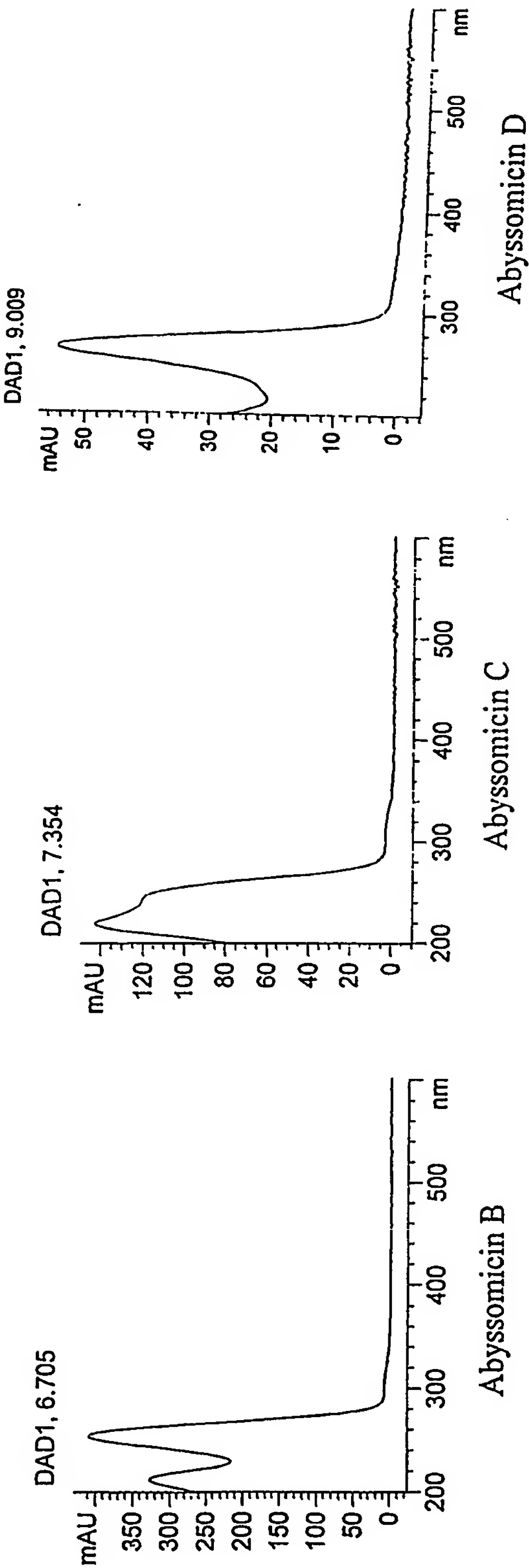


Fig. 5

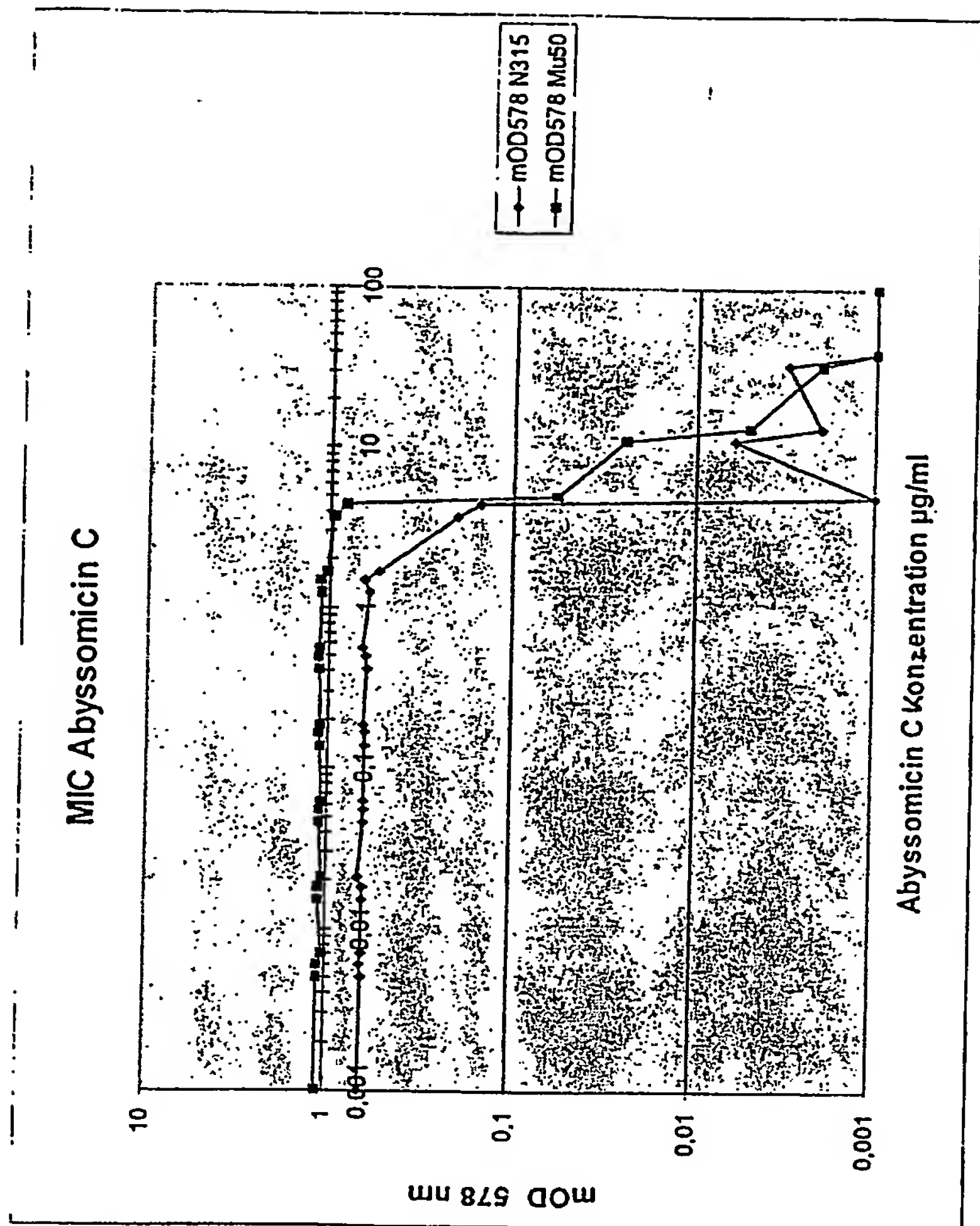
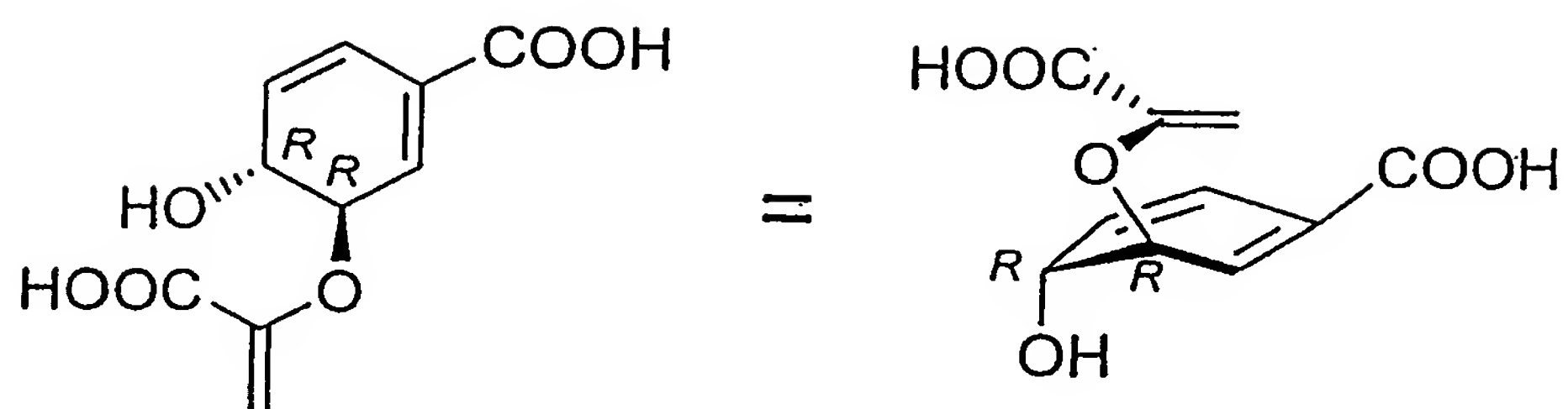


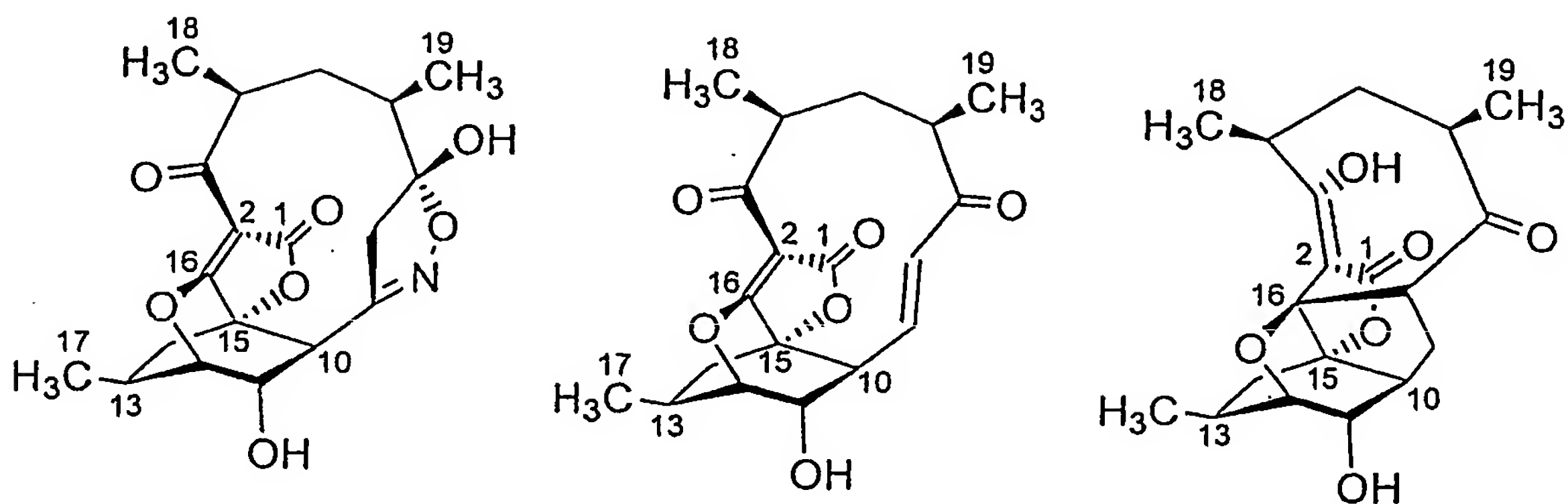
Fig. 6

BEST AVAILABLE COPY

(A)



(B)

Fig. 7

SEQUENCE LISTING

<110> Universität Tübingen

<120> Polyzyklische Makrolactone

<130> P 43 326 DE

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1440

<212> DNA

<213> Verrucosisspora spec., Stamm AB 18-032

<400> 1

caagtccgagc ggaaaggccc ttcgggggtac tcgagcggcg aacgggtgag taacacgtga	60
gcacactgcc ctaggctttg ggataaccct cggaaacggg ggctaatacc gaatattcac	120
cgggcgcc atgtttgtgg gtggaaagtt tttcggcttg ggatgggctc gcggcctatc	180
agcttggttg tggggtaatg gcctaccaag gcgacgacgg gtagccggcc tgagagggcg	240
accggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtggggaat	300
attgcacaat gggcggaagc ctgatgcagc gacgccgcgt gagggatgac ggccttcggg	360
ttgtaaacct ctttcagcag ggacgaagcg caagtgacgg tacctgcaga agaagcgccg	420
gccaaactacg tgccagcagc cgcggtaaga cgtagggcgcc gagcgttgtc cggatttatt	480
gggcgtaaag aactcgtagg cggcttgctc cgtcgactgt gaaaaccctg ggctcaactg	540
cgggcctgca gtcgatacgg gcaggctaga gttcggtagg ggagactgga attcctgggtg	600
tagcggtgaa atgcgcagat atcaggagga acaccggtgg cgaaggcggg tctctgggcc	660
gataactgacg ctgaggagcg aaagcgtggg gagcgaacag gattagatac cctggtagtc	720
ctgtgtaa acgttggggc ctaggtgtgg ggggcctctc cggttctctg tgccgcagct	780
cgcattaa gcgccccgcc tggggagtac ggccgcaagg ctaaaactca aaggaattga	840
cggggggccc cacaacgggc ggagcatgcg gattaattcg atgcaacgcg aagaacctta	900
cctgggtttg acatcgccgg aaatcctgca gagatgtggg gtccttcggg gccggtgaca	960
ggtggcgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt gggttaagtc ccgcaacgag	1020
cgcaaccctc gtcccatggt gccagcaatt cggttgggga ctcatgggag actgccgggg	1080
tcaactcgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcatcatg ccccttatgt ccagggcttc	1140
acgcatgcta caatggccgg tacaatgggc tgcgataccg tgaggtggag cgaatcccaa	1200
aaagccggtc tcagttcgga tcgggggtctg caactcgacc ccgtgaagtc ggagtcgcta	1260
gtaatcgag atcagcaacg ctgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg	1320
tcacgtcacg aaagtcggca acaccgaag ccggtggccc aacccttggt gagggagccg	1380

tcgaagggtgg ggctggcgat tgggacgaag tcgtaacaag gtagccgtac cggaagggtgc 1440

PCT/EP2004/010661

